

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22689044

研究課題名(和文) 造精機能障害における精巣幹細胞分化異常の可能性－責任遺伝子の同定と機能解析－

研究課題名(英文) Feasibility of abnormal development of spermatogonial stem cells in impaired spermatogenesis; detection of disease genes and functional analyses

研究代表者

水野 健太郎 (Mizuno, Kentaro)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：70448710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,300,000円、(間接経費) 5,790,000円

研究成果の概要(和文)： 精巣が先天性に下降しない停留精巣患者の二大合併症は、造精機能障害と悪性腫瘍化である。従来、停留精巣の造精機能障害の原因として、温度環境など後天的要因の影響が大きいと考えられてきたが、私たちは精子幹細胞の機能異常、すなわち先天性要因が重要と考えている。本研究は精子幹細胞の分化に関わる遺伝子を明らかにし、造精機能障害の病態を解明することを目的とした。その結果、ヒト精巣組織や停留精巣モデル動物を用いた解析から、複数の候補遺伝子を同定できた。その中には塩基配列によらないエピジェネティックな発現調節を行う遺伝子も含まれており、幹細胞分化には多様なメカニズムが関与していることを明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)： Two major complications of cryptorchidism, in which the testes did not congenitally descended into scrotum, are impaired spermatogenesis and testicular cancer. Although it is reported that some acquired factors such as high temperature surrounding testis are involved in the impaired spermatogenesis, we consider that congenital factor, dysfunction of spermatogonial stem cells, is more important. In the present research, our aim is elucidation of genes associated with stem cell development and etiology of impaired spermatogenesis. As a result, we could detect some candidate genes by analyses using human testicular tissues or cryptorchid model animals. Among them, epigenetic regulators of gene expressions are also included. In conclusion, we could uncover several mechanisms involved in development of spermatogonial stem cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：精子幹細胞 細胞分化

1. 研究開始当初の背景

停留精巣に関する基礎研究は多岐にわたり、(1) 発生頻度や地域差・人種差などの疫学、(2) 精巣下降のメカニズム解明、(3) 環境ホルモン・化学物質などの精巣への影響・毒性、(4) 造精機能障害の原因とその対策・治療法、(5) 悪性腫瘍の発生機構、等のテーマに大別することができる。これらの中で臨床的に大きな問題となるのは、造精機能障害と悪性腫瘍化であり、これまで私達は以下のような研究に取り組んできた。

- ・造精機能障害に対する上皮成長因子(EGF)の有効性 (J Urol. 2005)
- ・アンドロゲン遮断による停留精巣モデル動物の確立 (Int J Urol., 2007)
- ・早期の固定術が造精機能障害の抑制に有効であること (J Urol. 2008)
- ・精子形成細胞のアポトーシスに付随してNF- κ B活性化が起きること (Urology, 2009) などである。

しかしながら、こうした後天的要因をいくら除去しても診断時すでに精巣組織所見が不良な症例では妊孕能が低いという報告 (Hadziselimovic F, Lancet, 2001) から、発生段階のより早い時期で精子形成細胞自体に何らかの異常が起きている可能性が考えられる。停留精巣組織ではA型精原細胞が減少していることから、私たちは、従来言われていた要因に加え、精巣幹細胞の機能異常こそ、停留精巣における造精機能障害の最も重要な要因であるのではないかと考えた。

本研究の準備段階として、ヒト停留精巣組織内における精原細胞の特性を分子生物学的手法を用いて示した。すなわち、手術時に生検した精巣組織を正常組織と比較し、Subtraction法で発現差を示す遺伝子群の同定を行ったところ、TPT1・EEF1A1・NuMA1等の遺伝子発現が亢進していることを明らかにすることができた (J Urol., 2009)。

2. 研究の目的

本研究では精子形成細胞の幹細胞であるA型精原細胞の分化に着目し、この過程に関わる遺伝子を同定するとともに、疾患との関連性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 精子幹細胞の分化時期の特定

実験動物(ラット)精巣における精子幹細胞の分化過程を組織学的に明らかにするため、胎児期から成獣期にかけての精巣組織を経時的に採取して実験に使用した。

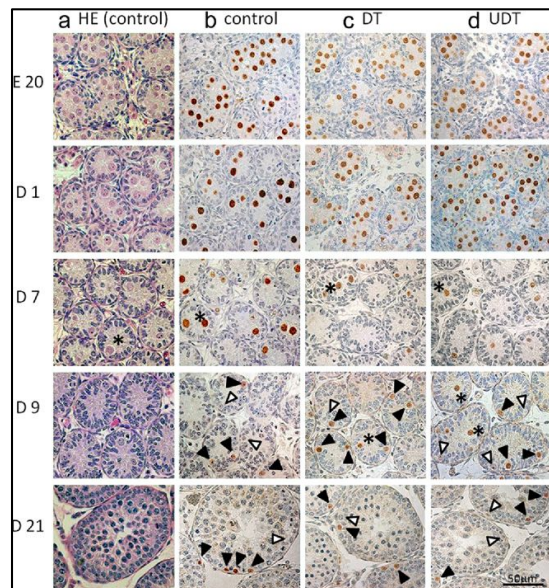
精子幹細胞および、その前駆細胞に発現するUTF1 (undifferentiated embryonic cell transcription factor 1) 遺伝子をマーカーとして使用した。さらに、胎児期に抗アンドロゲン剤を曝露された停留精巣モデルラットと正常ラットとを比較し、UTF1発現が陽性細胞の数、形態、について検討を行った。解析方法として、定量RT-PCR法、Western

blotting法、免疫染色法などを用いた。

(2) 幹細胞分化に関わる遺伝子群の同定
研究で得られた結果をもとに、正常と停留精巣モデル動物との間で、発現差を示す遺伝子群をマイクロアレイ解析で検索した。cDNAマイクロアレイと、microRNAマイクロアレイの2種類を行い、得られた結果を定量RT-PCRで確認した。

4. 研究成果

(1) 精巣におけるUTF1の発現は、胎児期で高く、生後から成獣になるにつれ、次第に低下していくことが判明した。免疫染色による詳細な組織の検討を行ったところ、ラット精巣では、生後9日目に前駆細胞から精子幹細胞への分化が顕著であった。停留精巣ではこの変化が遅れ、さらにUTF1陰性/陽性細胞比が有意に高いことを見いだした(下図はUTF1免疫染色を示す;論文9より引用)。



(Control: 正常精巣、DT: 薬剤投与したが下降した精巣、UDT: 停留精巣、E20: 胎生20日、D1-21: 生後1-21日、HE染色およびUTF1免疫染色を示す)

(2) 正常および胎生期に抗アンドロゲン剤を曝露された個体の、生後9日目の精巣組織を採取し、それぞれからmRNA、あるいはmicroRNAを抽出し、マイクロアレイ解析を行った。その結果、mRNAマイクロアレイでは、ヒストンタンパク脱メチル化酵素であるKdm5aが停留精巣で有意に増加していることを見いだした。また、microRNAマイクロアレイからは、miR-135aが停留精巣で有意に低下することを見いだした。

Kdm5aは前駆細胞から精子幹細胞で発現しており、ヒストンタンパクH3K4の脱メチル化を行う。停留精巣ではH3K4me2/3が低下していた。さらに精子形成細胞の培養株であるGC-1細胞にKdm5aを強制発現させると、幹細胞マーカーであるNgn3, Oct3/4, Ret, Thy1などの発現が著明に亢進することを明らかにした(論文2)。

miR-135a の精巣における局在を in situ hybridization 法で検討したところ、精細管内に位置することを明らかとした。さらに miR-135a の標的遺伝子として、複数の予測プログラムから FoxO1 遺伝子を同定した。レポーターアッセイを行い、miR-135a が FoxO1 を抑制することを確認でき、さらに FoxO1 は精子幹細胞に発現していることを明らかにした(論文3)。

これらの研究から、精子幹細胞分化にヒストン修飾や、microRNA による発現調節など、エピジェネティックな機構が関わっていることが明らかとなった。これまで精子形成の初期段階でも関与するという報告はなく、新たな知見と考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

【雑誌論文】(計 21 件)

- . Mizuno K, Kojima Y, Kamisawa H, Moritoki Y, Nishio H, Nakane A, Kurokawa S, Kohri K, Hayashi Y. Elucidation of distinctive genomic DNA structures in patients with 46,XX testicular disorders of sex development using genome-wide analyses. *J Urol.* 2014 (in press) doi: 10.1016/j.juro.2014.02.044. 【査読あり】
- . Nishio H, Hayashi Y, Moritoki Y, Kamisawa H, Mizuno K, Kojima Y, Kohri K. Distinctive changes in histone H3K4 modification mediated via Kdm5a expression in spermatogonial stem cells of cryptorchid testes. *J Urol.* **191**: 1564-72, 2014. doi: 10.1016/j.juro.2013.10.071. 【査読あり】
- . Moritoki Y, Hayashi Y, Mizuno K, Kamisawa H, Nishio H, Kurokawa S, Ugawa S, Kojima Y, Kohri K. Expression profiling of microRNAs in cryptorchid testes: miR-135a contributes to the maintenance of spermatogonial stem cells by regulating FoxO1. *J Urol.* **191**: 1174-80, 2014. doi: 10.1016/j.juro.2013.10.137. 【査読あり】
- . Mizuno K, Kojima Y, Kamisawa H, Moritoki Y, Nishio H, Kohri K, Hayashi Y. Gene expression profile during testicular development in patients with SRY-negative 46,XX testicular disorder of sex development. *UROLOGY*, **82**: 1453. e1-7, 2013. doi: 10.1016/j.urology.2013.08.040. 【査読あり】
- . Mizuno K, Hayashi Y, Kamisawa H, Nishio H, Moritoki Y, Kohri K. Expression analysis of the pluripotency marker UTF-1 for determining the applicability of testis-sparing surgery for prepubertal testis tumors. *J Pediatr Surg Case Rep.*, **1**: 125-8, 2013. [http://www.jpascasereports.com/article/S2213-5766\(13\)00044-4/abstract](http://www.jpascasereports.com/article/S2213-5766(13)00044-4/abstract) 【査読あり】
- . Qin XY, Kojima Y, Mizuno K, Ueoka K, Massart F, Spinelli C, Zaha H, Okura M, Yoshinaga J, Yonemoto J, Kohri K, Hayashi Y, Ogata T, Sone H. Association of variants in genes involved in environmental chemical metabolism and risk of cryptorchidism and hypospadias. *J Hum Genet.* **57**: 434-41, 2012. doi: 10.1038/jhg.2012.48. 【査読あり】
- . Qin XY, Sone H, Kojima Y, Mizuno K, Ueoka K, Muroya K, Miyado M, Hisada A, Zaha H, Fukuda T, Yoshinaga J, Yonemoto J, Kohri K, Hayashi Y, Fukami M, Ogata T. Individual variation of the genetic response to bisphenol a in human foreskin fibroblast cells derived from cryptorchidism and hypospadias patients. *PLoS One.* **7**: e52756, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0052756. 【査読あり】
- . Mizuno K, Kojima Y, Kamisawa H, Kurokawa S, Moritoki Y, Nishio H, Hayashi Y, Kohri K. Feasible etiology of vanishing testis regarding disturbance of testicular development: histopathologic and immunohistochemical evaluation of testicular nubbins. *Int J Urol.* **19**: 450-6, 2012. doi: 10.1111/j.1442-2042.2011.02951.x. 【査読あり】
- . Kamisawa H, Kojima Y, Mizuno K, Imura M, Hayashi Y, Kohri K. Attenuation of spermatogonial stem cell activity in cryptorchid testes. *J Urol.* **187**: 1047-52, 2012. doi: 10.1016/j.juro.2011.10.170. 【査読あり】
- . Nishio H, Mizuno K, Moritoki Y, Kamisawa H, Kojima Y, Mizuno H, Kohri K, Hayashi Y. Clinical features and testicular morphology in patients with Kallmann syndrome. *Urology.* **79**: 684-6, 2012. doi: 10.1016/j.urology.2011.10.032. 【査読あり】
- . Moritoki Y, Kojima Y, Mizuno K, Kamisawa H, Kohri K, Hayashi Y. Intratesticular pressure after testicular torsion as a predictor of subsequent spermatogenesis: a rat model. *BJU Int.* **109**: 466-70; discussion 470, 2012. doi: 10.1111/j.1464-410X.2011.10279.x. 【査読あり】
- . Iwatsuki S, Kojima Y, Mizuno K, Kamisawa H, Umemoto Y, Sasaki S, Kohri K, Hayashi Y. Endocrine assessment of prepubertal boys with a history of cryptorchidism and/or hypospadias: a pilot study. *J Urol.* **185**: 2444-50, 2011. doi: 10.1016/j.juro.2011.01.018. 【査読あり】
- . Kojima Y, Mizuno K, Kamisawa H, Kato T, Kohri K, Hayashi Y. Laparoscopic management of nonpalpable testis: new

- treatment strategy. *J Endourol.* **25**: 635-40, 2011. doi: 10.1089/end.2010.0496. 【査読あり】
1. Mizuno K, Kojima Y, Kurokawa S, Kamisawa H, Kohri K, Hayashi Y. Altered expression and localization of estrogen receptors alpha and beta in the testes of a cryptorchid rat model. *Urology.* **77**: 251.e1-6, 2011. doi: 10.1016/j.urology.2010.06.035. 【査読あり】
2. Kato T, Kojima Y, Kamisawa H, Takeuchi M, Mizuno K, Sasaki S, Kohri K, Hayashi Y. Findings of fat-suppressed T2-weighted and diffusion-weighted magnetic resonance imaging in the diagnosis of non-palpable testes. *BJU Int.* **107**:290-4, 2011. doi: 10.1111/j.1464-410X.2010.09513.x. 【査読あり】
3. 水野健太郎, 神沢英幸, 西尾英紀, 林祐太郎:ここまで明らかになっている性分化疾患の遺伝子異常。臨床泌尿器科、**65**: 911-918、2011. <http://ci.nii.ac.jp/naid/40019039070/> 【査読なし】
4. 林祐太郎, 小島祥敬, 水野健太郎, 郡健二郎:先天性生殖器疾患の発症機序の分子生物学的解明—遺伝因子と環境因子。Urology Today、**18**: 62-66、2011. http://www.molcom.jp/item_detail/159793/ 【査読なし】
5. 水野健太郎:臨床医学の展望 2011 泌尿器科学 男性不妊。日本医事新報、4530:59、2011. <http://ci.nii.ac.jp/naid/40018269472/> 【査読なし】
6. Mizuno K, Hayashi Y, Tozawa K, Iwatsuki S, Kojima Y, Kohri K. Single-nucleotide polymorphism in WT1 gene in a hyperplastic intralobar nephrogenic rest with botryoid protrusion. *Urology.* **76**: 149-52, 2010. doi: 10.1016/j.urology.2009.09.012. 【査読あり】
7. Kamisawa H, Kojima Y, Mizuno K, Imura M, Kohri K, Hayashi Y. Spermatogenesis after 1-stage fowler-stephens orchiopexy in experimental cryptorchid rat model. *J Urol.* **183**: 2380-4, 2010. doi: 10.1016/j.juro.2010.02.2387. 【査読あり】
21. Shibata Y, Kojima Y, Mizuno K, Nakane A, Kato T, Kamisawa H, Kohri K, Hayashi Y. Optimal cutoff value of contralateral testicular size for prediction of absent testis in Japanese boys with nonpalpable testis. *Urology.* **76**: 78-81, 2010. doi: 10.1016/j.urology.2010.02.043. 【査読あり】
- 【学会発表】(計 25 件)
1. 水野健太郎, 神沢英幸, 守時良演, 西尾英紀, 林祐太郎, 郡健二郎:ゲノムワイド解析を用いた精巣発生メカニズムの解明。第 64 回名古屋市立大学医学会総会、2013.12.8、名古屋市
2. 水野健太郎, 神沢英幸, 守時良演, 西尾英紀, 岩月正一郎, 梅本幸裕, 佐々木昌一, 林祐太郎, 郡健二郎:精子幹細胞分化におけるアンドロゲンの役割。日本アンドロロジー学会第 32 回学術大会、2013.7.26-7、大阪市
3. Mizuno K, Hayashi Y, Kamisawa H, Moritoki Y, Nishio H, Imura M, Shibata Y, Kurokawa S, Nakane A, Kato T, Maruyama T, Kojima Y, Kohri K. Functional analysis of Rho signaling cascade concerned with cell adhesion in the process of testicular development. AUA 2013 Annual Meeting, 2013.5.4-8, San Diego, CA, USA.
4. Mizuno K, Hayashi Y, Kamisawa H, Moritoki Y, Nishio H, Imura M, Shibata Y, Kurokawa S, Nakane A, Kato T, Maruyama T, Kojima Y, Kohri K. Elucidation of genomic DNA structures distinctive of patients with 46,XX testicular DSD using genome-wide analyses. Society for Pediatric Urology's 61st Annual Meeting, 2013.5.3-5, San Diego, CA, USA.
5. 水野健太郎, 神沢英幸, 守時良演, 西尾英紀, 林祐太郎, 郡健二郎:精巣発生における細胞接着制御 Rho シグナル伝達系の機能解析。第 101 回日本泌尿器科学会総会、2013.4.25-28、札幌市
6. Mizuno K, Hayashi Y, Iwatsuki S, Kamisawa H, Umemoto Y, Kojima Y, Sasaki S, Kohri K. Mechanisms of male germ cell development in the prepubertal testis. 10th International Congress of Andrology, 2013.2.23-6, Melbourne, Australia.
7. Mizuno K, Kojima Y, Kurokawa S, Kamisawa H, Umemoto Y, Moritoki Y, Nishio H, Sasaki S, Hayashi Y, Kohri K. Elucidation of genomic DNA structures distinctive of patients with 46,XX testicular DSD using genome-wide analyses. 10th International Congress of Andrology, 2013.2.23-6, Melbourne, Australia.
8. Mizuno K, Kojima Y, Hayashi Y, Kohri K. Symposium "DSD & Genital Reconstruction": Sex differentiation of the gonad at the molecular level. 14th Annual Congress of Asia-Pacific Association of Pediatric Urologists, 2012.10.4-6, Busan, Korea
9. Mizuno K, Kojima Y, Kurokawa S,

Kamisawa H, Imura M, Moritoki Y, Nishio H, Kato T, Hayashi Y, Kohri K. Elucidation of genomic DNA structures distinctive of patients with 46,XX testicular DSD using genome-wide analyses. 26th congress of the Societe Internationale d'Urologie, 2012.9.30-10.4, Fukuoka, Japan

水野健太郎、小島祥敬、守時良演、神沢英幸、西尾英紀、井村誠、黒川寛史、中根明宏、加藤利基、丸山哲史、林祐太郎、郡健二郎：精巣発生における SOX3 遺伝子の役割。第 21 回 日本小児泌尿器科学会総会、2012.7.4-6、岡山市

水野健太郎、佐々木昌一、小島祥敬、黒川寛史、守時良演、神沢英幸、西尾英紀、林祐太郎、郡健二郎：CGH アレイ解析を用いた精巣発生メカニズムの網羅的解析。第 31 回 日本アンドロロジー学会、2012.6.29-30、神戸市

Mizuno K, Kojima Y, Kurokawa S, Kamisawa H, Imura M, Moritoki Y, Nishio H, Shibata Y, Nakane A, Kato T, Maruyama T, Hayashi Y, Kohri K. Functional analysis of spermatogonial stem cells in cryptorchidism using EEF1A1 and TPT1 gene expression as indexes of cell differentiation. AUA 2012 Annual Meeting, 2012.5.19-23, Atlanta, GA, USA

水野健太郎、小島祥敬、守時良演、神沢英幸、西尾英紀、林祐太郎、郡健二郎：染色体構造分析による精巣発生メカニズムの解明。第 100 回日本泌尿器科学会総会、2012.4.21-24、横浜市

水野健太郎、西尾英紀、守時良演、神沢英幸、梅本幸裕、小島祥敬、河合憲康、戸澤啓一、佐々木昌一、林祐太郎、郡健二郎：核出術により精巣温存が可能であった小児精巣腫瘍の 1 例。第 255 回日本泌尿器科学会東海地方会、2012.3.11、名古屋市

水野健太郎、林祐太郎、郡健二郎：停留精巣の治療時期に関する update—精巣固定術の時期と精子幹細胞機能との関連性—。(シンポジウム) 第 61 回日本泌尿器科学会中部総会、2011.11.16-18、京都市

水野健太郎：停留精巣における Germ cell Apoptosis。(シンポジウム) 第 43 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会、2011.9.9-10、高槻市

水野健太郎、小島祥敬、神沢英幸、守時良演、西尾英紀、林祐太郎、郡健二郎：精巣発生に關与する新規カスケード ROCK1-SOX9 シグナル伝達系の同定。第 20 回日本小児泌尿器科学会総会、2011.7.13-15、秋田市

水野健太郎：精子幹細胞分化制御因子 EEF1A1・TPT1 による造精機能の予測。(シ

ンポジウム) 日本アンドロロジー学会第 30 回学術大会、2011.7.22-23、東京都

水野健太郎：停留精巣の遺伝子解析、そして遺伝子治療へ。(医道白寿企画) 第 99 回日本泌尿器科学会総会、2011.4.21-24、名古屋市

水野健太郎、守時良演、丸山哲史、河合憲康、佐々木昌一、林祐太郎、郡健二郎：精原細胞分化マーカー EEF1A1・TPT1 遺伝子の経時的発現動態からみた停留精巣における精子幹細胞機能。第 99 回日本泌尿器科学会総会、2011.4.21-24、名古屋市

21 水野健太郎、小島祥敬、西尾英紀、神沢英幸、守時良演、戸澤啓一、林祐太郎、郡健二郎：45,XO/46,XY DSD 女児に対する単孔式腹腔鏡下性腺摘除術。第 60 回日本泌尿器科学会中部総会、2010.11.30-12.2、名古屋市

22 水野健太郎、小島祥敬、神沢英幸、岩月正一郎、黒川寛史、西尾英紀、守時良演、梅本幸裕、佐々木昌一、林祐太郎、郡健二郎：精巣幹細胞分化制御因子 EEF1A1・TPT1 による停留精巣の将来の造精機能の予測。日本アンドロロジー学会第 29 回学術大会総会、2010.7.30-31、武蔵野市

23 水野健太郎、小島祥敬、神沢英幸、加藤利基、丸山哲史、林祐太郎、郡健二郎：精巣幹細胞分化制御 EEF1A1・TPT1 による停留精巣の将来の造精機能の予測。第 19 回日本小児泌尿器科学会総会、2010.6.30-7.2、札幌市

24 Mizuno K, Kojima Y, Kamisawa H, Kurokawa S, Iwatsuki S, Sasaki S, Hayashi Y, Kohri K. The impact of the genes associated with differential expression in the XX male testis on spermatogenesis. 1st WCPU, 2010.5.27-30, San Francisco, CA, USA.

25 水野健太郎：造精機能障害の予測因子としての精子幹細胞特異的マーカーの確立。(ヤングリサーチグラント受賞者記念講演) 第 98 回日本泌尿器科学会総会、2010.4.27-30、盛岡市

【図書】(計 0 件)

【産業財産権】

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

【その他】

水野健太郎、瀨本周造：泌尿器科疾患治療最前線 VOL.5。11p 中日新聞 2011 年 8 月 2 日号、2011

6. 研究組織

(1)研究代表者

水野 健太郎 (MIZUNO KENTARO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：70448710

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

林 祐太郎 (HAYASHI YUTARO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：40238134

小島 祥敬 (KOJIMA YOSHIYUKI)
福島医科大学・医学部・教授
研究者番号：60305539

黒川 覚史 (KUROKAWA SATOSHI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：50468253

神沢 英幸 (KAMISAWA HIDEYUKI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：00551277

守時 良演 (MORITOKI YOSHINOBU)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：50595395

西尾 英紀 (NISHIO HIDENORI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・臨床
研究医
研究者番号：10621063